

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-66314

(P2001-66314A)

(43)公開日 平成13年 3月16日 (2001.3.16)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/92		G 0 1 N 33/92	Z 2 G 0 4 5
27/447		33/68	
33/68		27/26	3 1 5 H

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁)

(21)出願番号	特願2000-183268(P2000-183268)	(71)出願人	599087556 ノーマン・イー・ミラー Norman E Miller 英国, ロンドン, シティ・ロード40, レキ シントン・アパートメント, アパートメン ト28
(22)出願日	平成12年 6月19日 (2000. 6. 19)	(71)出願人	599087567 ナズィーム・エム・ナンジー Nazeem M Nanjee 英国, ロンドン, ミドルセックス, ハイ ズ, チャービル・レーン73
(31)優先権主張番号	特願平11-176653	(74)代理人	100103160 弁理士 志村 光春
(32)優先日	平成11年 6月23日 (1999. 6. 23)		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質代謝異常の検出方法及びこれを用いる疾病の検出方法

(57)【要約】

【課題】HDLに関する脂質代謝異常を検出するための指標を見出し、この指標を用いて、脂質代謝異常に起因する疾病の検出手段を提供すること。

【解決手段】末梢の細胞から余剰のコレステロールを肝臓へと転送するコレステロールの逆転送系において、この機構の初発因子であり、末梢の細胞からコレステロールを引き抜く役割を担う、preβHDLとして分類されるHDLを指標として、血液検体中のpreβHDLの経時的な挙動を測定することによる脂質代謝異常の検出方法、およびこの検出方法により被検者の脂質代謝異常を検出し、この結果において被検者の前記の脂質代謝異常により惹起され得る疾病の状態を検出する疾病の検出方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】血液検体中のpreβHDLの経時的な挙動を測定することによる、脂質代謝異常の検出方法。

【請求項2】血液検体中のpreβHDLの経時的な挙動の測定を、経時的なインキュベーション条件下で行う、請求項1記載の脂質代謝異常の検出方法。

【請求項3】血液検体中のpreβHDLの経時的な挙動の測定が、血液検体中のpreβHDL量の定量による測定である、請求項1又は2記載の脂質代謝異常の検出方法。

【請求項4】血液検体中のpreβHDL量の定量方法として、二次元交差免疫電気泳動法を用いる、請求項3記載の脂質代謝異常の検出方法。

【請求項5】脂質代謝異常が、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の異常、コレステリルエステル転送蛋白質(CETP)の異常、リン脂質転送蛋白質(PLTP)の異常及びこれらの蛋白質の基質となるHDLの異常からなる群から選ばれる1種又は2種以上の脂質代謝異常である、請求項1ないし4のいずれかの請求項記載の脂質代謝異常の検出方法。

【請求項6】請求項1ないし5のいずれかの請求項記載の脂質代謝異常の検出方法により被検者の脂質代謝異常を検出し、この結果において被検者の前記の脂質代謝異常により惹起され得る疾病の状態を検出する、疾病の検出方法。

【請求項7】疾病が、冠動脈疾患、脳動脈疾患、糖尿病、高血圧又は肥満である、請求項6記載の疾病の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、疾病の検出方法に関する技術分野の発明であり、さらに具体的には、脂質代謝異常を検出して、これにより、被検者の疾病を検出する方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】低密度リポ蛋白質(LDL)あるいは、その酸化修飾されたリポ蛋白質は、動脈硬化発症の引金となり、また動脈硬化症を促進することで、冠動脈疾患(CHD)へと進展させると考えられている。このような観点から、血中のLDLコレステロールの上昇は、冠動脈疾患進展のリスクの優れた指標であると考えられている。実際に、数多くの食事指導療法、あるいは薬剤治療等によるLDLコレステロールを低下させる臨床試験により、血中のLDLの濃度を低下させることが、冠動脈疾患の発症の低下につながるとの証拠が得られている。例えば、スタチン系薬剤を代表する高脂血症治療薬の効果として、最近では、米国における①4S

(Scandinavian Simvastatin Survival Study)の臨床試験において、CHDが認められる高コレステロール血症者の、CHDによる死亡率を42%減少させていると

いう結果が得られている。また、②プラバスタチンを服用している高コレステロール血症者を対象とした、WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study)、あるいはロバスタチンを服用している境界領域の高コレステロール血症者を対象とした、AFCAPS/TexCAPS (the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study)においては、CHDの発症を、約3割程度減少させていることが示されている。③その他、多くの血中LDL濃度を低下させ得る薬剤についての臨床試験(薬剤の単独投与又はこれらの薬剤同士の併用)において、例えば、冠動脈撮影における、冠動脈肥厚の変化はわずかであるにもかかわらず、CHD発症の著明な低下が報告されている。

【0003】しかしながら、例えば、上記の②において記載したように、HMG-CoA還元酵素阻害剤を代表とする、スタチン系の薬剤により、CHDの発症は、約30%減少したことが明らかにされたが、このことは、逆に、残りの約70%は、薬剤を服用しているにもかかわらず、CHD発症の危険にさらされていることになる。このことは、LDL以外のCHDのリスクファクター、例えば、高血圧症、喫煙、糖尿病、肥満、低HDLコレステロール血症等のリスクファクターが、CHDの発症に大きく関与しているということが、さらに浮き彫りにされたことにもなる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】これらLDL以外のCHDのリスクファクターのうちでも、「HDLコレステロール」は、CHD発症の優れた指標として期待されているものの一つである。従来より、疫学的調査により、HDLコレステロールは、CHD発症頻度と逆相関し、低HDLコレステロール血症は、CHDのリスクファクターとして注目されている。すなわち、低HDLコレステロール血症により、CHD発症を、ある程度予知することが可能であり、また、低HDLコレステロール血症は、高LDLコレステロール血症等の、他のCHD発症危険因子とは関係なく、独立したリスクファクターであることが、Framingham Heart Studyの臨床試験によって得られている。また、他の臨床試験(コレステラミンを用いたthe Lipid Research Clinics Primary Prevention Trial、及びフィブレート系の薬剤を用いたthe Helsinki Heart Study)において、HDLコレステロールの増加は、LDLコレステロールの低下に関係なく、CHDの発症を減少させていたことが報告されている。また、ナイアシンとコレステロール、あるいはコレステロールとロバスタチンを服用したFATS (the Familial Atherosclerosis Treatment Study)においては、冠動脈狭窄病変の改善は、LDLコレステロールの低下、あるいはHDLコレステロールの増加によって予測することが可能であると報告しており、NCEP (the Adult Treatment Panel II of the National Cholesterol Education

Program)においては、CHD発症のリスクファクターは、HDLコレステロールの低下であると同定し、健康成人は、総コレステロールと共に、HDLコレステロールをスクリーニングするべきであることを提唱している。

【0005】HDLの生体内の代謝については、詳細には明らかでないのが現状である。どのようにHDLが生体内で抗動脈硬化的に作用しているのか、正確には証明されていないが、近年、HDLの代謝についていくつかの見解が得られている。

【0006】原始HDLは、ディスク状の形態をしており、アポプロテインA1の主要蛋白質とリン脂質で構成されている。このディスク状の原始HDLは、 $\text{pre}\beta_1$  HDLと呼ばれている。この $\text{pre}\beta_1$  HDL（原始HDL）が、末梢細胞よりフリーコレステロールを引抜き、粒子サイズが大きくなり、 $\text{pre}\beta_2$  HDLとなる。 $\text{pre}\beta_2$  HDLは、さらに、血中のレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）の作用により、脂肪酸を粒子中に取込み、エステル型コレステロールを蓄積して、 $\text{pre}\beta_3$  HDLとなり、粒子サイズがさらに大きくなる。 $\text{pre}\beta_3$  HDLは、LCATの作用により、さらにエステル型コレステロールを蓄積して、粒子サイズの大きなHDL<sub>3</sub>へと転換される。HDL<sub>3</sub>は、LCAT、あるいはリン脂質転送蛋白質（PLTP）により、HDL<sub>2a</sub>へと変換される。HDL<sub>2a</sub>は、コレステリルエステル転送蛋白質（CETP）の作用により、アポプロテインB含有リポ蛋白質（VLDL, LDL）とエステル型コレステロールとトリグリセライドの交換反応を行い、HDL<sub>2b</sub>へと変換される。HDL<sub>2b</sub>は、さらに、肝性リパーゼ（HTGL）の作用により、 $\text{pre}\beta_1$  HDLとHDL<sub>3</sub>に変換される。また、 $\text{pre}\beta_1$  HDLは、前述のHDL<sub>3</sub>にPLTPが作用しても産生され、この過程では、HDL<sub>2a</sub>と $\text{pre}\beta_1$  HDLが形成されることになる。このように、HDLは、いくつかのサブポピュレーションが、血中の酵素や転送蛋白質の作用を受け、形態や粒子サイズを変化させ代謝されている。また、それぞれのサブポピュレーションが異なる機能を有していると考えられている。

【0007】 $\text{pre}\beta_1$  HDLの形成、あるいは代謝に関与している血中のタンパク質は、上述したごとく、LCAT、HTGL、PLTP及びCETPと考えられている。さらに、 $\text{pre}\beta$  HDLは、リポ蛋白質同士との融合によっても産生されると考えられている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、末梢の細胞から余剰のコレステロールを肝臓へと転送するコレステロールの逆転送系において、この機構の初発因子であり、末梢の細胞からコレステロールを引き抜く役割を担う、 $\text{pre}\beta$  HDLとして分類されるHDLを指標とす

ることにより、冠動脈疾患等を惹起し得る脂質代謝異常を検出し得ることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明者は、本願において、血液検体中の $\text{pre}\beta$  HDLの、経時的な挙動を測定することによる脂質代謝異常の検出方法（以下、本発明検出方法という）および本発明検出方法により被検者の脂質代謝異常を検出し、この結果において被検者の前記の脂質代謝異常により惹起され得る疾病の状態を検出する疾病の検出方法（以下、本発明疾病検出方法という）を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。上述のように、本発明検出方法は、血液検体中の $\text{pre}\beta$  HDLの経時的な挙動を測定することにより、脂質代謝異常を検出する方法である。

【0011】本発明における「 $\text{pre}\beta$  HDL」とは、上述したHDLの代謝系において、 $\text{pre}\beta_1$  HDL、 $\text{pre}\beta_2$  HDL及び $\text{pre}\beta_3$  HDLの3つの段階のすべてのHDLを含む概念である。

【0012】 $\text{pre}\beta$  HDLは、その密度が、1.210 (g/ml)以上と、様々のHDLの中でも、粒子サイズが小さく、一番重いHDLであり、粒子サイズが大きく低密度〔1.063～1.210 (g/ml)〕のHDL<sub>2</sub>（HDL<sub>2a</sub>及びHDL<sub>2b</sub>）やHDL<sub>3</sub>は、 $\text{pre}\beta$  HDLの定義からは除外される（これらの $\text{pre}\beta$  HDL以外のHDLを、 $\alpha$  HDLともいう）。

【0013】本発明検出方法においては、 $\text{pre}\beta$  HDLを血液検体中において、経時的に、その挙動を測定する。本発明において、「血液検体」とは、全血、血清、血漿、脳脊髄液等を意味するものである。これらの血液検体の中でも、臨床検査における現実的な効率等を考慮すると、本発明においては、好ましくは血清や血漿を、特に好ましくは血漿を用いることができる。

【0014】血液検体における $\text{pre}\beta$  HDLの挙動を測定するために、インキュベーション条件下、具体的には、血液検体を、37℃付近で経時的に加温しつつ定量することが好ましい。単に、血液検体中の $\text{pre}\beta$  HDLの存在を測定するのみでは、血中の $\text{pre}\beta$  HDLは、脂質代謝異常症においても存在する故に、これを動脈硬化等の生体情報の指標としては用いることは難しい。

【0015】このような、血液検体における $\text{pre}\beta$  HDLの挙動を経時的に定量して測定する方法として、例えば、下記①②のような方法を挙げることができる。なお、これらの方法は、あくまでも例示である。

【0016】①二次元免疫交差電気泳動法（2D-CIEP）：この方法は一次元目の電気泳動として、アガロース電気泳動を行い、HDLのサブポピュレーションを大まかに分画（ $\text{pre}\beta$  HDLと $\alpha$  HDL）し、さらに、抗体を含む支持体（アガロース）を用いて二次元目

の電気泳動を行うことにより、一次元目で分離した各HDL分画を、ロケット免疫泳動法の原理に基づいて定量的に測定する方法である。本方法により、pre  $\beta$  HDLと $\alpha$  HDLのHDLサブポピュレーションの解析が可能である。本法は、後述の二次元電気泳動法による転写膜への転写効率を考慮する必要がなく、用いたサンプルのHDL分画を直接的に測定している点で、再現性、および定量性に優れている。

【0017】②二次元電気泳動法（2D-nativePAGE）：この方法は一次元目の電気泳動として、アガロース電気泳動を行い、さらに二次元目の電気泳動として、nativePAGE（ポリアクリルアミド電気泳動）を行うことにより、一次元目で分離したHDLサブポピュレーションを、さらに粒子サイズの違いによって明確にする方法である。本方法により、pre  $\beta_1$  HDL、pre  $\beta_2$  HDL、pre  $\beta_3$  HDL、 $\alpha$  HDL（HDL<sub>2</sub>とHDL<sub>3</sub>）の細かなHDLのサブポピュレーションの解析が可能である。しかしながら、本方法は、最終的な検出手段として、ウェスタンブロット法と特異抗体を用いた免疫反応を行わなければならない、転写効率の面から、あるいは用いる抗体の特性等の違いにより、測定値の再現性、および定量値にバラツキが大きい点に留意する必要がある。また、操作の煩雑さを考慮すると、大量の検体を用いる測定に用いるにはより多くの困難を伴うことになる。

【0018】このように、血液検体におけるpre  $\beta$  HDLの挙動を、経時的に定量して測定することができる。上述のようにして、pre  $\beta$  HDLの挙動を経時的に測定することにより、例えば、以下の事項を明らかにすることが可能である（具体的には、後述する実施例において説明する）。

【0019】①健康者は、37℃にて、2時間のインキュベーションにより、pre  $\beta$  HDLは減少し、その後、さらに16～24時間のインキュベーションにより増加する。

【0020】②冠動脈疾患を惹起する素因のある脂質代謝異常を測定することが可能である。すなわち、糖尿病や高血圧、さらには冠動脈疾患を惹起起こすリスクの高い肥満者においては、経時的な37℃でのインキュベーションによるpre  $\beta$  HDLの産生量が多い〔高トリグリセライド（TG）血症においては、pre  $\beta$  HDLが、より多く存在する傾向が強い〕。また、実際に冠動脈疾患を罹患している者においては、経時的なインキュベーションの前後においても、血液検体におけるpre  $\beta$  HDLの存在量は非常に高い。

【0021】③抗動脈硬化的な作用を呈さない高HDL血症であるCETP欠損症（Zong S, et al., J Clin Invest, 1996, 97:2917-2923）においては、経時的な37℃でのインキュベーションにより、血液検体中のpre  $\beta$  HDLが、若干増加する。

【0022】④LCAT欠損症においては、2時間程度のインキュベーションで、pre  $\beta$  HDLは消失せず、16～24時間のインキュベーションにより、初期値よりも、徐々に増加する。

【0023】⑤HDL<sub>3</sub>に、リコンビナントPLTPを添加し、16～24時間程度のインキュベーションをすることにより、pre  $\beta$  HDLの産生が認められる。

【0024】⑥HDL<sub>3</sub>に、リコンビナントCETPを添加し、16～24時間程度のインキュベーションをすることによっても、pre  $\beta$  HDLの産生が認められない。

【0025】以上のように、血液検体中のpre  $\beta$  HDLの挙動を把握することにより、冠動脈疾患の原因となり得る脂質代謝異常を測定することが可能になり、特に、予防医学上の意義が大きい。よって、本発明検出方法により被検者の脂質代謝異常を検出して、この結果を解析することにより、被検者の疾病の状態を検出する、本発明疾病検出方法が提供される。

【0026】ここで「疾病の状態」とは、疾病に現実罹患している場合における状態のみを意味するものではなく、将来に罹患するリスク等の被検者の疾病の傾向等、その疾病に関連する事項を意味するものである。また、疾病とは、脂質代謝異常、特に、HDLの代謝系の異常により惹き起こされ得る疾患、例えば、心筋梗塞や狭心症等の冠動脈疾患、脳梗塞等の脳動脈疾患、糖尿病、高血圧、肥満等を意味するが、これらに限定されるものではない。

【0027】また、本発明検出方法によって、血液検体中のpre  $\beta$  HDLの挙動を把握することにより、血中に存在するリポタンパク代謝酵素及び転送蛋白質の作用による、生体内でのコレステロール逆転送系の動態を知ることが可能である。さらに、このことは、コレステロール逆転送系に関わる各因子の総括的な指標を知ることにもなる。

【0028】

【実施例】以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、この実施例の記載により、本発明の技術的範囲が限定されるものではない。まず、後述する試験例において用いるpre  $\beta$  HDLの測定方法について説明する。

【0029】二次元交差免疫電気泳動法（2D-CIEP）によるpre  $\beta$  HDLの測定

1. アガロース電気泳動（一次元目）：1gのアガロースを100mlの泳動バッファー（45mM Tris-HCl, 40mM ホウ酸, 1mM カルシウム, 0.1% アジ化ナトリウム, pH8.8）に加熱溶解後、56℃に保ち、1mlの30%BSAを添加し、良く攪拌する。次いで、予め加温し、水平に置かれたガラス板（33×11×0.2cm）に速やかに広げる。その後、ガラス板を4℃に冷却し、ゲルを固める。ゲルが固まったことを

確認し、ウェルパンチャー（2mm径）を用いて、3cm間隔でサンプルウェルを作成する。マーカー、及び血漿サンプルを各ウェルに3μl加え、上記の泳動バッファーにて、2-6℃、250Vの定電圧で約1時間で泳動を行う。

【0030】2. 交差電気泳動（二次元目）：一次元目の電気泳動をしたガラス板を泳動層より取り外し、各サンプルを原点より3×3.5cm幅のゲルを外科用メスを用いて切り取り、一次元目の泳動方向より90°時計回りに回転させて二次元目のガラス板（33×11×0.2cm）に各サンプル隙間無く置く。次いで、このガラス板を56℃に加温する。1gのアガロースを100mlの泳動バッファーに加熱溶解し、ゲルを56℃に保ち、さらに3gのポリエチレンクリコール8000（シグマ社製）と1滴のTween 20（シグマ社製）を加え溶解させる。このゲル溶解液60mlに、450μlのヤギ抗ヒトapoA1血清（15mg/ml IgG：International Immunology社製）を加え、素早く混和した後、予備加温した二次元目のガラス板に均一になるように二次元目のゲルを作成する。次いで、ゲルを4℃に冷却し、ゲルを固める。ゲルが完全に固まったら、一次元目と同様に、泳動バッファーで、2-6℃、150Vの定電圧で約6時間で泳動を行う。

### 【0031】3. 染色

泳動後、泳動層からガラス板を取り外し、2Lの生理食塩水にゲルをガラス板ごと一晚浸し、未反応の抗体を取り除く。次いで、ゲルをゲルボンДФィルム（ファルマシア社製）の上に載せ、生理食塩水を予め湿らせた濾紙（ワットマン社製）を一枚載せる。さらに、キムタオルを5枚、ガラス板を重ねておき、1kgの重石を載せ、ゲルをゲルボンДФィルムに固定する。次いで、ドライヤーを用いてゲルを乾燥させる（あるいは40℃の孵卵機に置いてよい）。ゲルが乾燥後、ゲルフィلمをCBB染色液〔0.5% Coomassie Blue R-250（シグマ社製）、10%酢酸、45%エタノール〕で30分間染色する。染色後、ゲルフィلمを脱色液（10%酢酸/45%エタノール溶液）にて脱色を行い、非特異的に付着した染色液を落とす。脱色後、ゲルフィلمを乾燥させる。

### 【0032】4. preβHDLの定量

preβHDLの定量は、上述のごとく二次元交差免疫電気泳動法にて得られたゲルフィلمをコピーし、分画されたpreβHDL分画とαHDL分画のそれぞれ重量を秤量し、重量（面積）%を算出することにより行う。血漿中のapoA1濃度にその求められた重量%を掛けることにより得られる。すなわち、preβHDL量は以下の式によって算出される。

$$\begin{aligned} \text{【0033】} & \text{pre}\beta\text{HDL (mg/ml)} = \text{apoA1} \\ & \text{(mg/ml)} \times \text{pre}\beta\text{HDL (重量\%)} \\ \text{pre}\beta\text{HDL (面積\%)} & = \text{pre}\beta\text{HDL (mg)} / \end{aligned}$$

$$[\text{pre}\beta\text{HDL (mg)} + \alpha\text{HDL (mg)}]$$

### 【0034】〔試験例1〕健常人におけるpreβHDLの測定および産生能の検討

健常人39名におけるpreβHDLの測定を、上述した方法で行った。preβHDLは、上述した計算式で算出することは可能であるが、以下の結果については、便宜上面積比による%で表現する。健常人39名より採取された血漿におけるpreβHDLの値は、 $3.6 \pm 2.5\%$  (mean ± SD) で0.0から10.8%と個体により幅広く分布していた。同様に、αHDLの値は、 $96.4 \pm 2.5\%$ であった。

【0035】さらに、これらの血漿を37℃にて2時間インキュベーションすると、これらpreβHDL、およびαHDLの値は、それぞれ $3.8 \pm 5.1\%$ 、および $96.2 \pm 5.1\%$ であった。preβHDLの値はインキュベーション前と同様に、0.0～14.6%と幅広く分布し、インキュベーション前の値と比較し、減少する場合、増加する場合、および変化しない場合が観察されたが、その多くは減少する傾向であった。

【0036】さらに、これらの血漿を37℃にて16時間インキュベーションすると、これらpreβHDL、およびαHDLの値は、それぞれ $12.1 \pm 10.7\%$ 、および $87.9 \pm 10.7\%$ であった。preβHDLの値は、インキュベーション前および2時間インキュベーション同様、0.0～37.9%と幅広く分布し、インキュベーション前の値と比較し、減少する場合（第1図）、増加する場合（第2図）、および変化しない場合（第3図）が観察されたが、その多くは増加する傾向であった（第4図）。さらに、健常人における16時間のインキュベーションによるpreβHDLの産生比、preβ<sub>1</sub>HDL（16/0）は、 $4.0 \pm 4.4$ であった。

【0037】上記の結果をまとめると、健常人血漿におけるpreβHDLは全く検出されないものから、約10%まで存在していることが明らかになった。また、血漿を37℃で2時間インキュベーションすることにより、血漿中に存在していたpreβHDLは、一旦は減少することが明らかとなった。このことは、血漿中に存在しているLCATの作用により、存在していたpreβHDLがその粒子サイズを大きくし、αHDLへと転換していることによると考えられた。しかしながら、preβHDL量の変化は上述のLCAT（以下、モジュレーションファクターともいう）によるαHDLへの転換による減少と、上述のpreβHDL産生血漿蛋白質（以下、プロダクションファクターともいう）の作用によるpreβHDLの産生量との差に基づくものである。よって、インキュベーションによりpreβHDL量が減少する場合は（モジュレーションファクター）プロダクションファクターであり、増加する場合は（モジュレーションファクター）プロダクションファク

ター)であり、変化の認められない場合は(モジュレーションファクター≡プロダクションファクター)であると考えられる。

#### 【0038】〔試験例2〕リン脂質転送蛋白質(PLTP)によるpreβHDL産生能についての検討

血漿を37℃で16時間インキュベーションすることにより、2時間インキュベーションで示したように一度減少したpreβHDLが再び増加することが明らかとなった。このことは、血漿中に存在するプロダクションファクター、すなわちコレステリルエステル転送蛋白質(CETP)、肝性リパーゼ(HTGL)、あるいはリン脂質転送蛋白質(PLTP)の作用により、新たにpreβHDLの産生がインキュベーション中に起こると考えられるが、EDTP血漿にはHTGLは存在しないため、新たに産生されたpreβHDLはCETP、あるいはPLTPの作用によって産生されたものと考えられる。とりわけ、PLTPはin vitroの実験において、HDL<sub>3</sub>から小粒子のpreβHDLとHDL<sub>2</sub> like particleを産生することが明らかになっている(Jauhainen M, et al., J Biol Chem, 1993, 268:4032-4036およびTu, A-Y, et al., J Biol Chem, 1993, 268:23098-23105)。

【0039】本発明においても、精製リコンビナントPLTPをHDL<sub>3</sub>と37℃にて、16時間インキュベートすると、preβHDLとHDL<sub>2</sub> like particleが産生されることが認められた(第5図)。すなわち、HDL<sub>3</sub>にはPLTP活性が認められないため、16時間インキュベーションにより産生されたpreβHDLは添加したリコンビナントPLTPによることが示された。

#### 【0040】〔試験例3〕コレステリルエステル転送蛋白質(CETP)によるpreβHDLの産生能についての検討

PLTPによるpreβHDLと同様に、精製リコンビナントCETPによるpreβHDLの産生能を検討した。第6図に示すように、精製リコンビナントCETPをHDL<sub>3</sub>と共に37℃で、16時間インキュベーションし、preβHDLの産生について検討したが、インキュベーションによるpreβHDLの産生は認められなかった。

【0041】生体内でCETPは、主にapoB含有リポ蛋白質とHDL間での脂質の交換反応に関与しており、HDL間でのpreβHDL産生には大きな役割を果たしていないことが示された。

#### 【0042】〔試験例4〕CETP欠損症におけるpreβHDLの産生能の検討

上述のごとく、血漿中のpreβHDLの産生には、少なくともCETP、およびPLTPの血中脂質転送蛋白質が関与していると考えられるが、より詳しくそのpreβHDL産生に関与する血中蛋白質を検討するために、血中CETP欠損症の血漿を用いて、preβHDL

産生能を検討した。6名のCETP欠損症(イントロン14スプライスドナーサイト+1G→A変異)ホモ接合体の血漿を、37℃、16時間インキュベーションし、preβHDL産生能を、上述の2D-CIEP法によって測定した。その結果、CETP欠損症におけるインキュベーション前のpreβHDL量は $12.6 \pm 6.7\%$ 、16時間インキュベーション後のpreβHDL量は $16.0 \pm 6.2\%$ であった。程度の差はあるがほとんどCETP欠損症ホモ接合体の血漿において、preβHDLの産生はインキュベーション前値と比較して増加傾向を示し、その産生量を比で表すと、産生量比preβHDL(16/0)は、 $1.5 \pm 0.7$ 倍であった(第7図)。

【0043】CETP欠損症におけるHDL量は健常者に比して、2倍(CETP欠損症ヘテロ接合体)から4倍(CETP欠損症ホモ接合体)高値であることが知られてる。従って、インキュベーション前のpreβHDL量が $12.6 \pm 6.7\%$ と健常者( $3.6 \pm 2.5\%$ )より約4倍高いことは、血中の高HDL血症によると考えられる。また、CETP欠損症においては、HDLはコレステリルエステルを多く含み、LDLはトリグリセリドを多く含み、ポリディスパースを示し小粒子のLDLが存在していること、およびPLTPはトリグリセリドを多く含むリポタンパクなどに対して、より高い基質親和性を示すこと(Rye KA, et al., J Lipid Res, 1998, 39:152-161)から、PLTPによるpreβHDLの産生量が高くなっていると考えられる。しかしながら、本CETP欠損症においては、血中CETP量が全く認められない(CETP活性が無い)ことを考えると、16時間インキュベーションによって産生されたpreβHDLは、PLTPの作用によって生じたものであると考えられる。さらに、16時間のインキュベーションによるpreβHDL産生比は、CETP欠損症ホモ接合体において、 $1.5 \pm 0.7$ と健常者( $4.0 \pm 4.4$ )よりも、明らかに低値を示していた。このことは、CETPも、血漿preβHDLの産生に関与しているか、あるいは、CETP欠損症においては基質であるHDLが血漿中のプロダクションファクターの作用を受けにくい状態にあるものと考えられる。

#### 【0044】〔試験例5〕肥満におけるpreβHDLの産生量の検討

同様に、肥満者におけるpreβHDL量、および16時間インキュベーション後、その産生量を測定した。5名の肥満者(BMI>30)におけるpreβHDL量は、 $6.9 \pm 2.5\%$ ( $4.2 \sim 10.0\%$ )であった。16時間インキュベーション後のpreβHDL産生量は、 $34.4 \pm 13.3\%$ ( $15.8 \sim 50.6\%$ )であり、その産生量比preβHDL(16/0)は、 $5.1 \pm 2.1$ であった(第6図)。

【0045】肥満は、多くの疾患の危険因子群と考えら

れている。特に、糖尿病発症の危険因子群であり、ひいては高トリグリセリド血症等の脂質代謝異常を起こし、心筋梗塞等の冠動脈疾患、高血圧を発症する例が多い。これら冠動脈疾患の危険因子群においても、16時間インキュベーションによるpre $\beta$ HDL産生量は、健常者よりも高いことが示された。

#### 【0046】〔試験例6〕CHD患者におけるpre $\beta$ HDLの産生量の検討

さらに、冠動脈疾患患者におけるpre $\beta$ HDLの産生量を検討するために、健常者131名を対照に、冠動脈造影検査により、少なくとも一枝以上の冠動脈に狭窄（75%以上の狭窄）が認められた患者35名におけるインキュベーション前、および16時間インキュベーション後のpre $\beta$ HDL量を測定した。その結果、健常者131名における、インキュベーション前後のpre $\beta$ HDL量は、それぞれ、（前） $18.7 \pm 4.7\%$ （ $3.7 \sim 42.4\%$ ）および（後） $25.8 \pm 10.6\%$ （ $6.6 \sim 46.1\%$ ）であった。これらは、アポ蛋白A-I濃度に換算すると、インキュベーション前 $27.3 \pm 8.1\text{mg/dl}$ 、インキュベーション後 $37.6 \pm 16.3\text{mg/dl}$ であった。一方、冠動脈疾患患者35名における、インキュベーション前後のpre $\beta$ HDL量は、それぞれ、（前） $10.1 \pm 3.4\%$ （ $5.7 \sim 20.7\%$ ）および（後） $8.9 \pm 4.4\%$ （ $2.6 \sim 17.8\%$ ）であった。これらは、アポ蛋白A-I濃度に換算すると、インキュベーション前 $10.8 \pm 5.1\text{mg/dl}$ 、インキュベーション後 $8.9 \pm 4.4\text{mg/dl}$ であった。すなわち、冠動脈疾患患者における、インキュベーション前のpre $\beta$ HDL量は、健常者と比較して有意に低下し（ $P < 0.01$ ）、また、16時間のインキュベーション後のpre $\beta$ HDLもまた、健常者よりも有意に低下する（ $P < 0.001$ ）ことが示された（第9図）。このことから、冠動脈疾患の危険因子を検索する上で、血漿中のpre $\beta$ HDL量は重要な意義を有し、さらに血漿をインキュベーションしてpre $\beta$ HDL量を測定することにより、一層、上記危険因子の検

出の精度を上げることが可能であることが明らかになった。

【0047】以上、pre $\beta$ HDL量は健常者に比して、CETP欠損症および冠動脈疾患患者において高値であることが示された。さらに、血漿を、37℃で16時間インキュベートした際のpre $\beta$ HDL産生量は、健常者に比して、冠動脈疾患患者群で有意（ $p < 0.01$ ）に低下していることにより、血漿を16時間インキュベートした際のpre $\beta$ HDL産生量を測定することにより、冠動脈疾患を診断することが可能となり、ひいてはその危険を早期に察知することが可能となり、予防的な治療を施すことが可能となる。

#### 【0048】

【発明の効果】本発明により、冠動脈疾患等の原因となり得る脂質代謝異常を検出することが可能な、特に予防医学上有用な脂質代謝異常の検出方法が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】インキュベーションにより、健常者の血漿pre $\beta$ HDLが減少する例を示した図面である。

【図2】インキュベーションにより、健常者の血漿pre $\beta$ HDLが増加する例を示した図面である。

【図3】インキュベーションにより、健常者の血漿pre $\beta$ HDLが変化しない例を示した図面である。

【図4】インキュベーションにより、健常者の血漿pre $\beta$ HDLの変化を示した図面である。

【図5】リン脂質転送蛋白質（PLTP）によるpre $\beta$ HDLの産生を示した図面である。

【図6】コレステリルエステル転送蛋白質（CETP）によるpre $\beta$ HDLの産生を示した図面である。

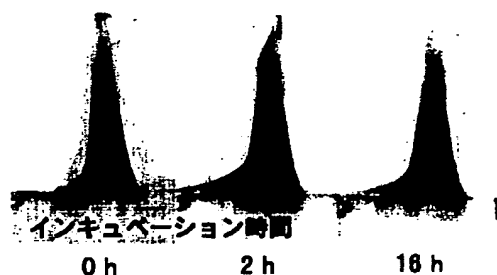
【図7】CETP欠損症におけるpre $\beta$ HDLの変化を示した図面である。

【図8】肥満者におけるpre $\beta$ HDLの変化を示した図面である。

【図9】冠動脈疾患患者（CHD）におけるpre $\beta$ HDLの変化を示した図面である。

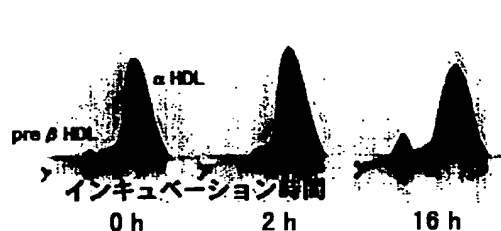
【図1】

第1図



【図2】

第2図

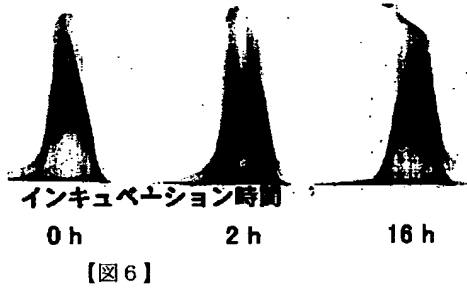


【図3】

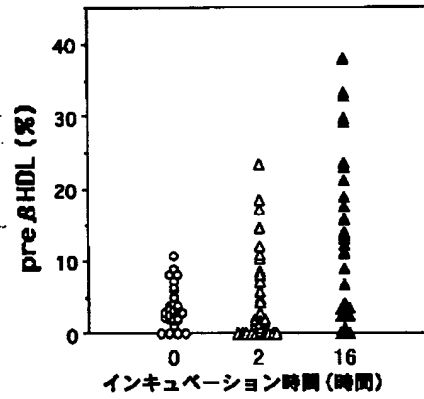
【図4】

【図5】

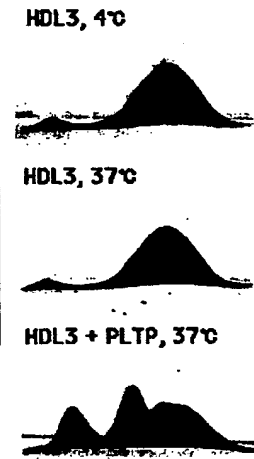
第3図



第4図

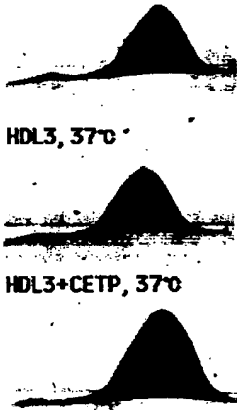


第5図



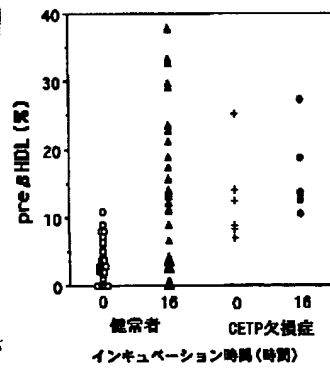
第6図

HDL3, 4°C



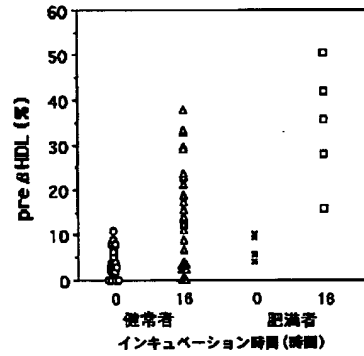
【図7】

第7図



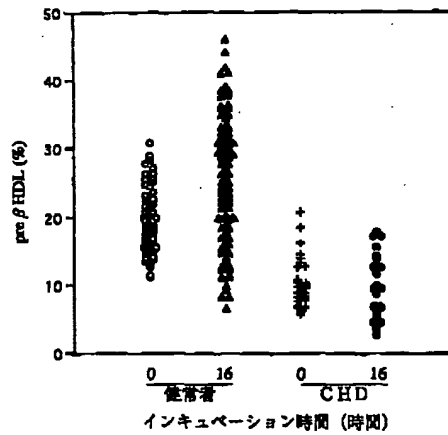
【図8】

第8図



【図9】

第9図





フロントページの続き

(71)出願人 599087556  
Apartment 28, Lexington  
Apartment, 40 City  
Road, London, England

(71)出願人 599087567  
73 Charville Lane, Hayes,  
Middlesex, London,  
England

(71)出願人 591083336  
株式会社ビー・エム・エル  
東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(72)発明者 服部 浩明  
埼玉県川越市市場1361-1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

(72)発明者 ノーマン・イー・ミラー  
英国, ロンドン, シティ・ロード40, レキシントン・アパートメント, アパートメント28

(72)発明者 ナズィーム・エム・ナンジー  
英国, ロンドン, ミドルセックス, ハイズ, チャービル・レーン73

(72)発明者 岡 智一郎  
埼玉県川越市市場1361-1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

(72)発明者 江頭 徹  
埼玉県川越市市場1361-1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 BB24 BB60 CA25  
CA26 DA63 FB03 FB05 GC07